

· 基础研究 ·

三七总皂苷对肺癌 A549 细胞
上皮间质转化的抑制作用阮越勇¹ 张浩军² 疏欣杨^{1,3} 李得民³ 刘 剑³ 王蓓蕾¹ 王泽宇¹ 韩春生³ 张纾难^{1,3}

摘要 目的 观察三七总皂苷(PNS)对体外经转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导肺腺癌 A549 细胞后发生上皮细胞间质化(EMT)的作用。**方法** 首先进行 PNS MTT 实验,然后再进行 PNS 干预 EMT 实验,将 A549 细胞随机分为 5 组:空白组加入 F-12 培养基,模型组及低、中、高浓度中药组分别加入 10 ng/mL TGF- β_1 和 62.5、125、250 μ g/mL PNS,继续培养 72 h。采用光学显微镜观察各组细胞的形态变化,采用实时荧光定量 PCR、Western Blot 及免疫荧光技术检测纤维连接蛋白(FN)、波形蛋白(Vim)、E-钙黏素(E-Cad)mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 31.25~500 μ g/mL PNS 对 A549 细胞无明显增殖作用。与空白组比较,模型组 FN mRNA 及蛋白表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),Vim 蛋白表达升高($P < 0.05$),E-Cad mRNA 及蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,高浓度中药组 FN mRNA 表达降低($P < 0.05$),E-Cad 及蛋白 mRNA 表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);低浓度、高浓度中药组 FN 蛋白表达降低($P < 0.05$),低、中浓度中药组 Vim 蛋白表达降低($P < 0.05$)。**结论** PNS 体外干预可提高 EMT 过程中上皮标志物 E-Cad 并抑制间质标志物 FN、Vim 的表达,高浓度时结果更为显著,对 EMT 过程有一定的干预作用。

关键词 三七总皂苷; A549 细胞; 上皮间质转化

Inhibitory Effect of *Panax Notoginseng* Saponins on Epithelial-mesenchymal Transition in Lung Cancer A549 Cells NGUYEN Viet-dung¹, ZHANG Hao-jun², SHU Xin-yang^{1,3}, LI De-min³, LIU Jian³, WANG Bei-lei¹, WANG Ze-yu¹, HAN Chun-sheng³, and ZHANG Shu-nan^{1,3} 1 Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 China-Japan Friendship Hospital Institute of Clinical Medicine, Beijing (100029); 3 Department of TCM Pulmonary Diseases, Center of Respiratory Medicine, China-Japan Friendship Hospital, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β_1 in lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods** PNS MTT experiment was conducted, and then A549 cells were randomly divided into blank group, model group, low, medium and high concentration PNS intervention group. And the blank group was added F-12 medium, model group was added TGF- β_1 (10 ng/mL), the PNS groups was added low (62.5 μ g/mL), middle (125 μ g/mL) and high (250 μ g/mL) concentration PNS respectively. The morphological changes of cells in each group were observed by optical microscopy, and the expression levels of fibronectin (FN), Vimentin (Vim), E-Cadherin (E-Cad) mRNA and protein were detected by Real-time quantitative PCR, Western Blot and immunofluorescence. **Results** PNS at 31.25–500 μ g/mL had no obvious effect on the proliferation of A549 cells. Compared with the blank group, PNS intervention EMT showed increased FN mRNA and protein expression in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), Vim protein expression increased ($P < 0.05$), E-Cad mRNA and protein expression decreased ($P < 0.05$). Compared with

基金项目:中日友好医院青年课题(No. 2014-3-QN-26)

作者单位:1. 北京中医药大学研究生院(北京 100029); 2. 中日友好医院临床医学研究所(北京 100029); 3. 中日友好医院中医肺病科,中日友好医院呼吸中心,国家呼吸疾病临床研究中心(北京 100029)

通讯作者:疏欣杨, Tel: 010-84205227, E-mail: xinyang_shu@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181023.210

the model group, FN mRNA expression decreased in the high concentration Chinese medicine group ($P < 0.05$), E-Cad and protein mRNA expression were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); FN protein expression decreased in the group with low concentration and high concentration of TCM ($P < 0.05$), Vim protein expression decreased in the group with low and medium concentration ($P < 0.05$). Conclusion PNS can improve the epithelial marker E-Cad and inhibit the expression of mesenchymal markers FN and Vim in the EMT process *in vitro*, and the results are more significant at high concentration, and thereby PNS showing certain intervention effect on the EMT process was concluded.

KEYWORDS *Panax notoginseng* saponins; A549 cells; epithelial-mesenchymal transition

肺纤维化是许多肺间质性疾病的最终病理表现,随着对疾病认识和诊断技术的提高,发病率有上升趋势。肺纤维化的特征为肺部成纤维细胞的聚集、大量胶原蛋白沉积以及基质重塑。至今肺纤维化的发病机制还不很清楚^[1,2]。近些年来肺泡上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为可能是肺纤维化病灶中肺部肌成纤维细胞激活聚集的机制之一,与肺纤维化关系密切而颇受重视^[3,4]。

三七为中医治疗肺纤维化时常用的活血化瘀类药物^[5],其中有效成分是三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS),既往有研究发现 PNS 对实验性的肺纤维化和肝纤维化有一定的抑制作用,能明显抑制博莱霉素诱导的大鼠纤维化肺组织中结缔组织生长因子的表达,可能影响肺纤维化的 EMT 病理过程^[6]。因此,本研究以人 A549 肺泡上皮细胞为研究对象,观察 PNS 对 EMT 的影响,进一步研究 PNS 抑制肺纤维化的作用特点和途径。

材料与方法

1 细胞系及细胞培养 A549 细胞株购于国家实验细胞资源共享平台,资源编号 3111C0001CCC000002。用 F-12 培养基(含有 100 IU/mL 青霉素,100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清)于 37℃,5% CO₂ 培养箱常规培养 A549 细胞,细胞汇合达到 80% 之后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代或进行有关实验。

2 药物及主要试剂、仪器 注射用血塞通(成分为 PNS),200 mg,购自哈尔滨珍宝制药有限公司,批号:F603031a4。F12 培养基(美国 HyClone 公司),货号:SH30026.01;胎牛血清(美国 Gibco 公司),货号:10099-141;胰酶(美国 HyClone 公司),货号:SH30042.01;DMSO(美国 Amresco 公司),货号:0231;MTT(美国 Sigma 公司),货号:M2128-1G;转化生长因子- β_1 (human transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1 , 美国 PeproTech 公司),批号 100-21-2;E-钙黏素(E-Cadherin, E-Cad)抗体(美国

Proteintech 公司),批号 20874-1-AP;纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)抗体(美国 Proteintech 公司),批号 15613-1-AP;波形蛋白(Vimentin, Vim)抗体(美国 Proteintech 公司),批号 10366-1-AP;山羊抗兔 IgG 二抗绿色(美国 Abbkine 公司),货号 A23220;山羊抗兔 IgG 二抗红色(美国 Abbkine 公司),货号 A23620;逆转录酶试剂盒(美国 Thermo Scientific),批号 00127224。CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific);酶标仪(美国 Thermo Scientific);倒置显微镜带荧光系统(日本 Olympus IX71);7500 Real-time PCR 仪(美国 Thermo Scientific);Tanon 4500 发光检测仪(上海天能科技有限公司)。

3 模型制备、分组及干预方法 取 6 孔培养板,每孔加入 2.5 mL 的 8×10^4 细胞,饥饿 12 h。将体外培养 A549 细胞分随机 5 组:空白组、模型组及低、中、高浓度中药组。空白组为 A549 细胞 + F-12 培养基,不含 TGF- β_1 ;模型组为 A549 细胞 + F-12 培养基 + 10 ng/mL TGF- β_1 ;中药组为 A549 细胞 + F-12 培养基 + 10 ng/mL TGF- β_1 + 低浓度(62.5 μ g/mL)、中浓度(125 μ g/mL)、高浓度(250 μ g/mL) PNS^[7]。继续培养 72 h。

4 检测指标及方法

4.1 MTT 法检测药物对细胞增殖的影响 以 5×10^3 的 A549 细胞加入到 96 孔板,培养 24 h。吸出培养液,加入含有不同质量浓度(31.25、62.5、125、250、500 μ g/mL)的药物,以 F-12 完全培养液作为正常对照,继续培养 24、48、72 h。加入 10 μ L MTT 后,放入孵育箱培养 4 h,再加 100 μ L 三联溶解液,放入孵育箱孵育过夜。490 nm 波长检测吸光度。正常孔的平均吸光度作为 100%,其他孔的吸光度除以正常孔的平均吸光度,乘以 100%,作为每孔的生存率。

4.2 细胞形态检测 将 6 孔板,倒置显微镜在 100 倍条件下观察每孔细胞。每组随机选择 5 个样本拍照,每个样本随机拍摄 5 个视野,照片用于细胞形态

检测。采用前期建立的细胞形态定量分析的方法分析 PNS 对 A549 细胞形态的影响。应用 Image Pro Plus 6.0 软件,定量检测细胞的圆弧度。

4.3 实时荧光定量 PCR(qPCR) 采用 Trizol 一步法提取细胞药物干预 72 h 后的总 RNA,鉴定 RNA 纯度后,反转录制备 cDNA,以 cDNA 为模板,在反应体系中加入目的基因(Fn、Vim、E-Cad)和内参对照基因(β -actin)的引物,设定反应参数,进行目的基因的扩增,以模板的 Ct 值和该模板的起始拷贝数存在为线性关系。其中以 FN、Vim、E-Cad、 β -actin, mRNA 全长 PubMed 序列为模板,应用 Oligo 7.0 软件进行设计。引物序列见表 1。

4.4 蛋白质印迹法(Western Blot) 分组收集用药物干预 A549 细胞 72 h 后的细胞,加入适量细胞裂解液,冰浴 30 min,高速离心后取上清采用 BCA 法测定蛋白浓度,调整到标准浓度后分别取 15 μ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳,半干转膜法转至 PVDF 膜。5%的脱脂奶粉封闭 1 h,分别加一抗,稀释比例为 β -actin(1:3 000),FN(1:3 000),Vim(1:3 000),E-Cad(1:250),放 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,再用抗兔 IgG 二抗(1:3 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 缓冲液洗膜 10 min $\times$ 3 次,用发光检测仪进行曝光拍照。以 β -actin 为内参,用 Quantily One 系统分析,并对凝胶条带的信号强度进行 E-Cad、FN、Vim 半定量分析。

4.5 免疫荧光检测 根据 qPCR 和 Western Blot 结果,选择高浓度的 PNS 进行荧光免疫检测。将细胞种植到 6 孔板,将细胞爬片放置孔底,分别加入 TGF- β_1 、高浓度 PNS 刺激 72 h。取出生长 72 h 的细胞爬片,移入一个干净的六孔板冷 PBS 浸泡不超过 3 min。每个玻片滴加 4% 的多聚甲醛冰上固定 15 min。用微量移液枪小心加一抗,稀释比例为 FN(1:100),Vim(1:100),E-Cad(1:100),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。PBS-Tween 洗,3 次 $\times$ 5 min。避光处,用微量移液枪加入二抗,稀释比例山羊抗兔绿色(1:150),红色(1:150),覆盖均匀平放室温孵育 1 h。每孔加 50 μ L 二抗,避光处,PBS-Tween 洗 3 次 $\times$ 5 min,将 6 孔板,倒置显微镜在 200 倍条件下观察每孔细胞。每组随机选择 5 个样本拍照,每个样本随机拍摄 5 个视野。应用

ImageJ 软件,处理细胞图片。

5 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用 One-Way ANOVA,方差齐性时多组间两两比较用 LSD 法,方差不齐时多组间两两比较用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 PNS 对 A549 细胞增殖的影响(图 1) 31.25 ~ 500 μ g/mL PNS 干预 24、48、72 h,未发现 PNS 对 A549 细胞有明显的增殖作用。

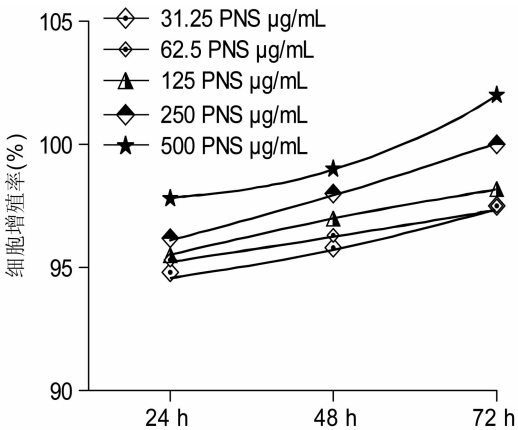


图 1 不同时间和浓度 PNS 对 A549 细胞增殖率的影响

2 各组细胞形态学变化的定量分析(图 2) 与空白组比较,模型组细胞形态发生明显变化,即从类似铺路石样的形态转变成伸长的纺锤样的形态,圆弧度降低($P < 0.01$)。与模型组比较,中浓度和高浓度组细胞还能保持原形态,细胞圆弧度值明显增高($P < 0.05$)。

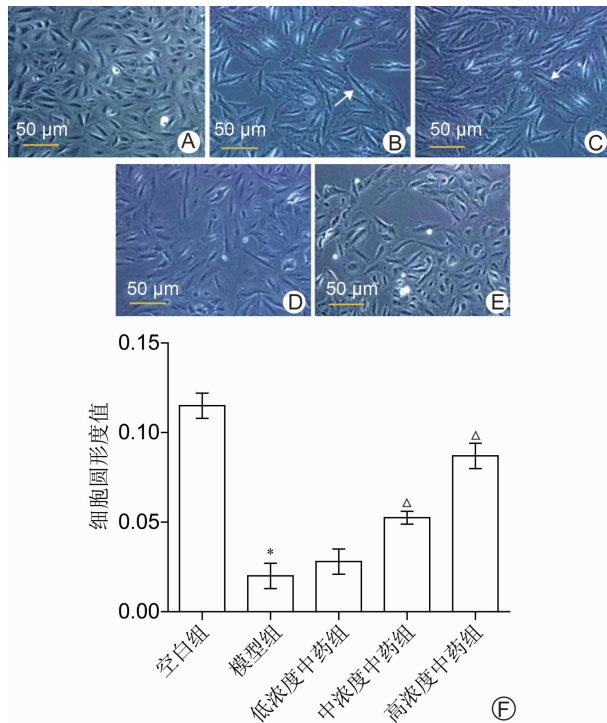
3 各组细胞 FN、Vim、E-Cad mRNA 表达比较(图 3) 与空白组比较,模型组 FN mRNA 表达升高($P < 0.01$),E-Cad mRNA 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,高浓度中药组 FN mRNA 表达降低($P < 0.05$),E-Cad mRNA 表达升高($P < 0.05$)。各组 Vim mRNA 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组细胞 FN、Vim、E-Cad 蛋白表达比较(图 4) 与空白组比较,模型组 FN 和 Vim 蛋白表达升高($P < 0.05$),E-Cad 蛋白表达降低($P < 0.01$)。与模

表 1 引物序列

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')	大小(bp)
FN	TTCCCATTATGCCGTTGGAG	GAAATGACCACTTCCAAAGCCTA	94
Vim	GGACTCTGATTAAGACGGTT	AGAAAGGCATTGAAAGCTG	173
E-Cad	GAACACATTTGCCCAATTCCA	ATATAGCTTGAAGTCCCGAA	298
β -actin	ATGACTTAGTTGCGTTACACC	GACTTCCTGTAACAACGCATC	275

型组比较,低、高浓度中药组 FN 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),低、中浓度中药组 Vim 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),高浓度中药组 E-Cad 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。



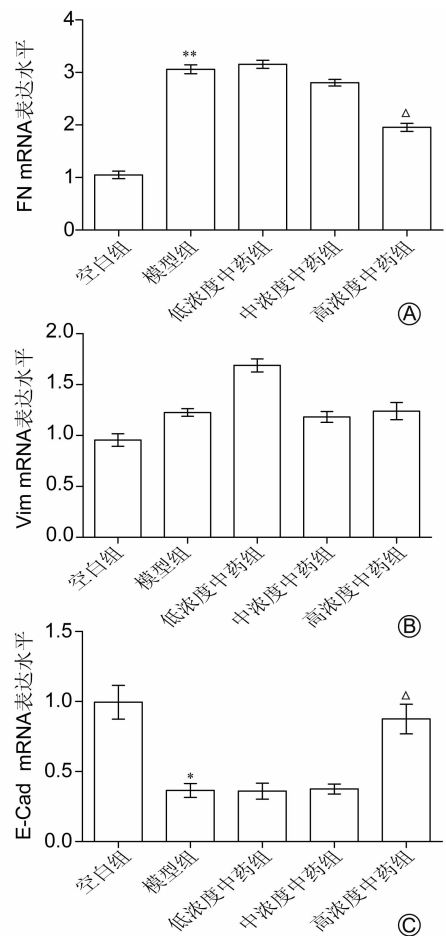
注:A-E 为各组细胞形态;A 为空白组;B 为模型组;C 为低浓度中药组;D 为中浓度中药组;E 为高浓度中药组;F 为各组细胞圆形成度值比较;箭头所指为纤维细胞;与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图2 各组细胞形态及细胞圆形成度值比较 (×200)

5 各组细胞荧光 FN、Vim、E-Cad 表达比较 (图 5) 与空白组比较,模型组 FN、Vim 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),E-Cad 表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,高浓度中药组 FN、Vim 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),E-Cad 表达升高 ($P < 0.05$)。

讨论

EMT 在胚胎发育、器官纤维化、肿瘤转移级联反应的早期阶段均可见到,其核心的细胞学机制表现为上皮标志物的表达与细胞间黏附 EMT 现象发生中,E-Cad 是组成上皮细胞间紧密连接的重要成分,也是上皮成分的关键性标志之一。通过 TGF- β_1 刺激信号输入后,细胞间的连接及细胞极性发生改变,细胞间紧密连接的破坏,上皮细胞丧失黏附特性,逐渐从基底膜上脱落;然后胞质内细胞骨架进行重排,表达新的表型蛋白如 α -SMA,胞质内肌丝也从上皮型的角蛋白转变为间质细胞的 Vim^[8,9]。

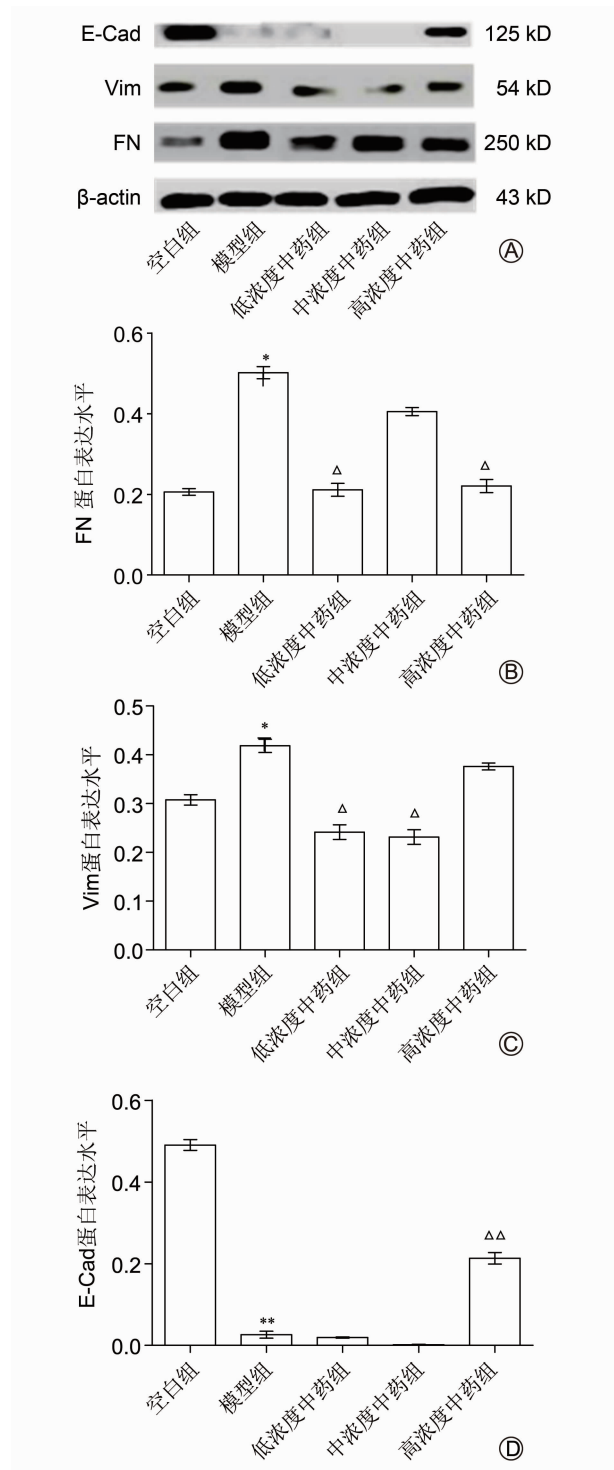


注:A 为 FN mRNA 表达;B 为 Vim mRNA 表达;C 为 E-Cad mRNA 表达;与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图3 各组细胞 FN、Vim、E-Cad mRNA 表达比较

PNS 有多种药理作用,包括降低机体的耗氧量,扩张脑血管,抗血栓形成,抗凝等^[10]。研究表明 PNS 对大鼠的肺纤维化有抑制作用,可能与 Smad2/3 的表达抑制有关^[11]。Smad 家族蛋白是细胞因子受体的胞内激酶底物,介导 TGF- β_1 对基因表达的调控;而 TGF- β_1 是强力的肺泡上皮细胞的间质转化刺激因子,通过 EMT 的诱导促进肺纤维化的形成和发展。推测 PNS 的抑制纤维化作用可能与抑制 TGF- β_1 诱导的 EMT 有关。为了明确具体的机制,需对 PNS 功能相关蛋白调控过程进行更深入的探索^[12,13]。

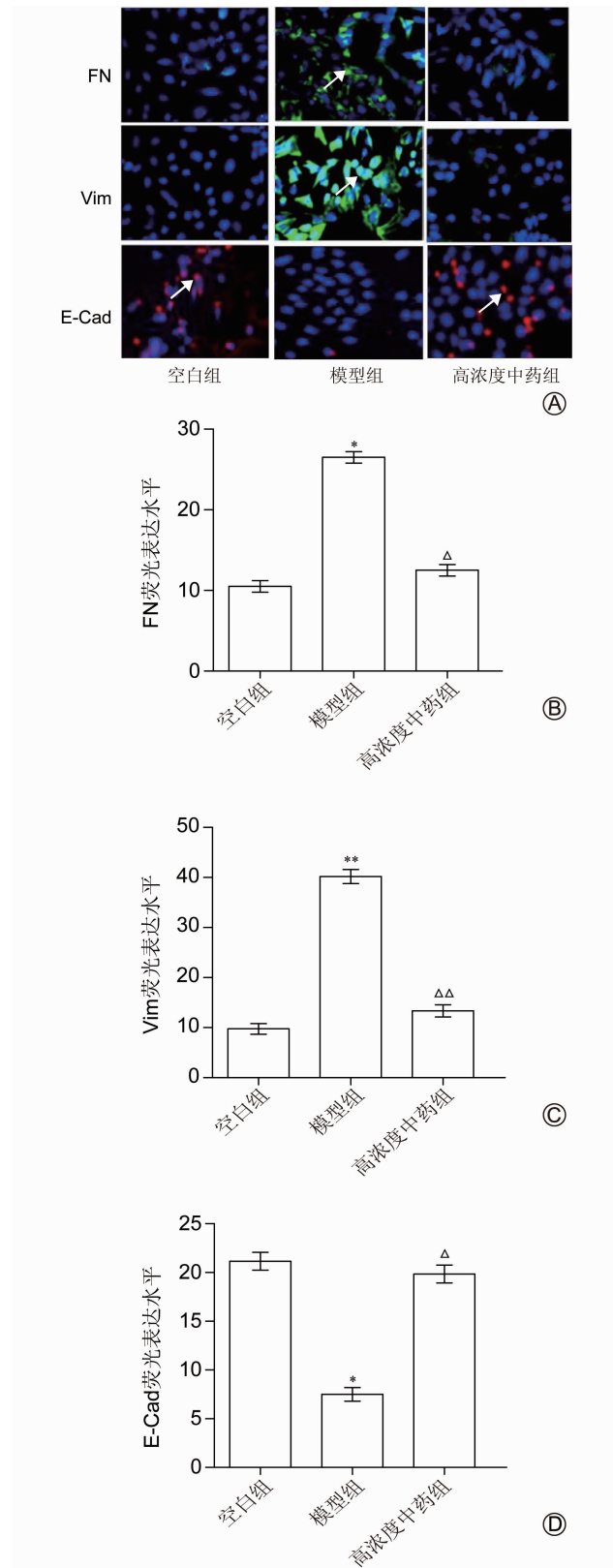
本实验在之前研究 PNS 干预 EMT 发生的基础上,进一步使用先进技术,如实时荧光定量、蛋白印迹法、免疫荧光技术,从分子角度来评价 PNS 的疗效。A549 细胞受到 TGF- β_1 诱导后,细胞的形态由铺路石状转化为梭状,可以用圆形成度衡量。前期工作中,增加了客观选择细胞、描记分离细胞、清除背景干扰等处理方法。应用该方法发现 TGF- β_1 诱导后,与空白组比较,



注:A 为各组蛋白 Western Blot 结果;B 为 FN 蛋白表达;C 为 Vim 蛋白表达;D 为 E-Cad 蛋白表达;与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 各组细胞 FN、Vim、E-Cad 蛋白表达比较

模型组的细胞形态发生了明显的变化,即从类似铺路石样的形态转变成伸长的纺锤样的形态,圆形度显著降低。细胞的圆形度值降低,提示细胞已转化为间质细胞;PNS 抑制这种变化,显示对肺泡 EMT 的抑制作用。



注:A 为各组免疫荧光结果;B 为 FN 荧光表达;C 为 Vim 荧光表达;D 为 E-Cad 荧光表达;与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;箭头所指为荧光表达区域

图 5 各组细胞 FN、Vim、E-Cad 表达比较 ($\times 200$)

用。肺泡 EMT 的特征之一,是细胞蛋白表达的改变,主要是上皮细胞特征性蛋白表达减少和间质特征性蛋白表达的增加。尽管 PNS 抑制 EMT,但对每种特征性蛋白亦有不同的影响。

三七为中医治疗瘀血型肺纤维化的常用药,功效既能活血又可止血^[14],PNS 是三七的主要有效成分,具有多种药理作用,临床应用的范围深广,其中包括治疗各种器官纤维化。本实验围绕肺纤维化的主题,研究 PNS 是否通过干预 EMT,而抑制肺纤维化的形成。EMT 即指上皮细胞在外界因素作用下,失去上皮特性,获得间质细胞的一种现象^[15,16]。通过 qPCR 和 Western Blot 法检测 FN、Vim、E-Cad 三种具有纤维化代表性的标志物,结果发现上皮细胞在 PNS 干预作用下,E-Cad mRNA 和蛋白表达增高,FN mRNA 和蛋白表达降低,Vim 蛋白表达降低。提示 PNS 能有效提高 E-Cad 并抑制 FN 和 Vim 的表达,上皮细胞能保持原来的特征性,从而抑制 EMT 的发生。

综上所述,本研究以肺癌 A549 细胞为模型,从形态学及 EMT 过程中上皮、间质基因及蛋白成分证实了 PNS 能有效抑制 TGF- β_1 诱导的 EMT 过程,尤其在高浓度条件下作用更为明显。但由于影响 EMT 的信号通路较多,因此今后研究可通过探讨 PNS 是通过哪个通路干预 TGF- β_1 导致的 EMT 过程来阐释其抗肺纤维化机制。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2018, 378(19): 1811 - 1823.
- [2] 黄振杰,曾彤华,蔡文华,等. TGF- β_1 诱导的肺泡上皮细胞间质转化及其机制探讨[J]. 中华肺部疾病杂志, 2016, 9(3): 292 - 296.
- [3] Jolly MK, WardC, Eapen MS, et al. Epithelial mesenchymal transition (EMT), a spectrum of states: role in lung development, homeostasis and disease[J]. Dev Dyn, 2018, 247(3): 346 - 358.
- [4] Park IH, Kang JH, Shin JM, et al. Trichostatin a inhibits epithelial mesenchymal transition induced

by TGF- β_1 in airway epithelium [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0162058.

- [5] 疏欣杨,韩春生,杨道文,等. 肺痿冲剂方治疗肺肾两虚、气虚血瘀型特发性肺纤维化临床观察[J]. 世界中医药杂志, 2014, 9(8): 983 - 986.
- [6] 全燕,夏前明,李福祥,等. 三七总皂苷对大鼠肺纤维化及结缔组织生长因子表达的影响[J]. 西南国防医学, 2009, 19(1): 23 - 25.
- [7] 任周新,余海滨,李建生,等. 三七总皂苷对肺泡上皮细胞间质转化的抑制作用[J]. 中国医药杂志, 2015, 40(23): 4667 - 4671.
- [8] Xie L, Zhou D, Xiong J, et al. Paraquat induce pulmonary epithelial-mesenchymal transition through transforming growth factor-b1-dependent mechanism [J]. Exp Toxicol Pathol, 2016, 68(1): 69 - 76.
- [9] Jones MG, Richeldi L. Recent advances and future needs in interstitial lung diseases [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2016, 37(3): 477 - 484.
- [10] 乔春玲,丁艳芬,杨崇仁. 三七总皂苷药理研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(11): 25 - 28.
- [11] 杨梁梓,吕路艳,张济周,等. 三七总皂苷对肺纤维化大鼠的 Smad 2/3 表达的影响[J]. 云南中医药杂志, 2011, 32(5): 65 - 66.
- [12] Tian K, Chen P, Liu Z, et al. Sirtuin 6 inhibits epithelial to mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis via inactivating TGF- β_1 /Smad 3 signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(37): 61011 - 61023.
- [13] 疏欣杨,李得民,韩春生,等. 上皮 - 间质转化在肺间质纤维化中的作用及中药干预机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3635 - 3637.
- [14] 高其若,耿志强. 中医运用三七治疗高脂血症的临床观察[J]. 上海医药, 2018, 39(11): 23 - 24.
- [15] 黄振杰,曾彤华,蔡文华. TGF- β_1 诱导的肺泡上皮细胞间质转化及其机制探讨[J]. 中华肺部疾病杂志, 2016, 9(3): 292 - 296.
- [16] 黄振杰,郑金旭,莫凯天,等. TGF- β_1 诱导肺泡上皮细胞间质转化[J]. 吉林医学, 2010, 31(29): 5062 - 5064.

(收稿: 2017 - 09 - 05 在线: 2018 - 11 - 24)

责任编辑: 赵芳芳